云 南 植 物 研 究 1988;10（2）：167—174
Acta Botanica Yunnanica

马槟榔种子中的葡糖硫甙硫酸酯和葡糖硫甙酶*

胡 忠

（中国科学院昆明植物研究所，昆明）

摘要 自马槟榔(*Capparis masaikai* Lévl.)种子中分离出一种新的葡糖硫甙硫酸酯，即2-羟乙基葡糖硫甙硫酸酯（2-hydroxyethylglucosinolate)，得率为干种仁的3%；在葡糖硫甙酶(pH 6.0)作用下，酶解产物为噁唑烷硫酮（oxazolidine-2-thione)。马槟榔种子中的葡糖硫甙酶用1 *N* 氯化钠提取，经硫酸铵沉淀，通过葡聚糖 G50凝胶过滤层析和羧甲基纤维素离子交换层析，得到纯制品。测得该酶分子量Mr = 116 kD，是由二个相近的亚基组成，等电点pI = 5.05。与文献中报道从十字花科植物中提取的葡糖硫甙酶是分子量为140 kD的糖蛋白不同，该酶未检出含糖。

关键词 马槟榔；葡糖硫甙硫酸酯；葡糖硫甙酶

很多植物，尤其是十字花科植物，都含有葡糖硫甙硫酸酯（glucosinolate）类化合物，其通式为：

$$R-\underset{}{\overset{\overset{\displaystyle S-C_6H_{11}O_5}{|}}{C}}=N-OSO_3^-$$

依R的不同，该类化合物有很多。据Kjaer[1]统计，至1973年已鉴定的达70多个。很多作者试图分析植物体内该类化合物的成分差异，探求十字花科植物的种源关系[2]。也由于其酶解产物多对人和牲畜有毒，该类化合物是十字花科栽培作物育种和籽种加工过程必须考虑的一种有毒成分[3]。对该类化合物及其水解酶葡糖硫甙酶（thioglucosidase）已有大量研究，但多限于十字花科植物。

马槟榔属白花菜科植物，与十字花科近缘。其种子是一种中药材，种仁嚼后呈持久甜味，这是由于内含甜味蛋白[4]。当种子吸胀或浸泡水中并保温一段时间，种子中会产生一种强苦味物质而将甜味掩盖。我们已鉴定出该物质为噁唑烷硫酮[5]。可以推测，马槟榔种子中含有2-羟乙基葡糖硫甙硫酸酯(2-hydroxyethylglucosinolate)（Ⅰ），酶解时产生噁唑烷硫酮（Ⅱ），反应式如下：

$$HOCH_2CH_2\overset{\overset{\displaystyle S-Glu}{|}}{C}=N-OSO_3^- \xrightarrow{\text{thioglucosidase}} \begin{cases} \to \text{Glucose} \\ \to [HOCH_2CH_2N{=}C{=}S] \to \text{oxazolidine-2-thione} \\ \to HOSO_3^- \end{cases}$$

（Ⅰ）　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　（Ⅱ）

(Ⅱ): ring H_2C—NH, H_2C—O—$C{=}S$

1987-08-26收稿

* Glucosinolate 尚无合适中译名，暂称为葡糖硫甙硫酸酯

化合物（Ⅰ）文献中尚未见报道。本文着重报告该化合物的分离鉴定，及马槟榔种子中葡糖硫甙酶的分离和特性。

材料和方法

1.材料

将马槟榔成熟果实在室温下堆放数日，待果肉软化后剥离出种子，阴干后置4℃下干燥存放。使用时去种壳，将种仁粉碎。

2.葡糖硫甙硫酸酯的制备

经石油醚脱脂后的种仁粉末用20倍量60%的丙酮水溶液于室温下搅拌提取1 h，$10^4\times g$ 离心去残渣，将上清液通过CM-纤维素离子交换柱以除去大部分碱性蛋白。流出液减压浓缩到粘稠状，加入甲醇提取，离心去沉淀，减压蒸去甲醇，残物用水溶解。水溶液通过强酸性阴离子交换柱（Dowex 2，HCO_3^- 型），弃去流出液，用0.2—0.6*N* $NaHCO_3$溶液梯度洗脱，225nm波长检测，收集吸收峰为227 nm的组分。在该组分溶液中加入适量Dowex 50 H^+ 阳离子交换树脂，使中和到中性。80℃下减压蒸干，残物用甲醇溶解，去沉淀。在小体积甲醇溶液中加入无水乙醇使沉淀，将沉淀分离并置干燥器中干燥成粉末。所得制品含葡糖硫甙硫酸酯约90%，得率为干种仁的3%。

3.葡糖硫甙酶的制备

制备程序和条件见图1。整个操作过程在4—10℃下进行。所用Sephadex G 50为Pharmacia公司产品，CM-cellulose 52为Whatman产品，超滤膜为YM 30，所制备的酶制品经冻干后存放于低温处。

4.葡糖硫甙酶特性的测定

（1）聚丙烯酰胺浓度梯度电泳　实验方法见文献[6]。样品、凝胶和缓冲液均不加变性剂，胶浓度8—30%，电泳于8℃下，150V 18 h。标准蛋白为牛血清蛋白BSA（66.2 kD）和铁蛋白ferritin（440 kD）。电泳后，将凝胶板切成三块。第一块按常规考马氏兰染色法，显示标准蛋白带。第二块按Henderson等方法[7，8]，将其浸没在含有葡糖硫甙硫酸酯2 mg/ml、氯化钡6 mg/ml和抗坏血酸2mg/ml的溶液中，于35℃保温12 h，白色的硫酸钡沉淀带显示为葡糖硫甙酶带，检出灵敏度高于考马氏兰法。第三块用于检测葡糖甙酶是否是糖蛋白，用PAS染色法[9]，将凝胶板置于7.5%醋酸中1 h后，在4℃下经0.2%过碘酸处理45 min，再在Schiff试剂中染色，糖蛋白呈红色带，否则就表示蛋白不含糖。

用酚-硫酸法测定纯化酶制品的含糖量[10]。

（2）SDS-聚丙烯酰胺电泳　按改良的Laemmeli[9]方法进行，胶浓度15%，蛋白质分子量标准为Sigma产品。经考马氏兰染色后根据色带迁移率计算酶亚基的分子量。

（3）聚丙烯酰胺等电聚焦电泳　电泳管0.4 I.D×10 cm，胶浓度5%，内含pH 5—7的Ampholine（LKB）2%。电泳聚焦完成后按（2）法显色，根据相应位置胶柱切段浸泡液的pH测定值，判定酶的等电点，操作法见文献[9]。

4.酶活性的测定

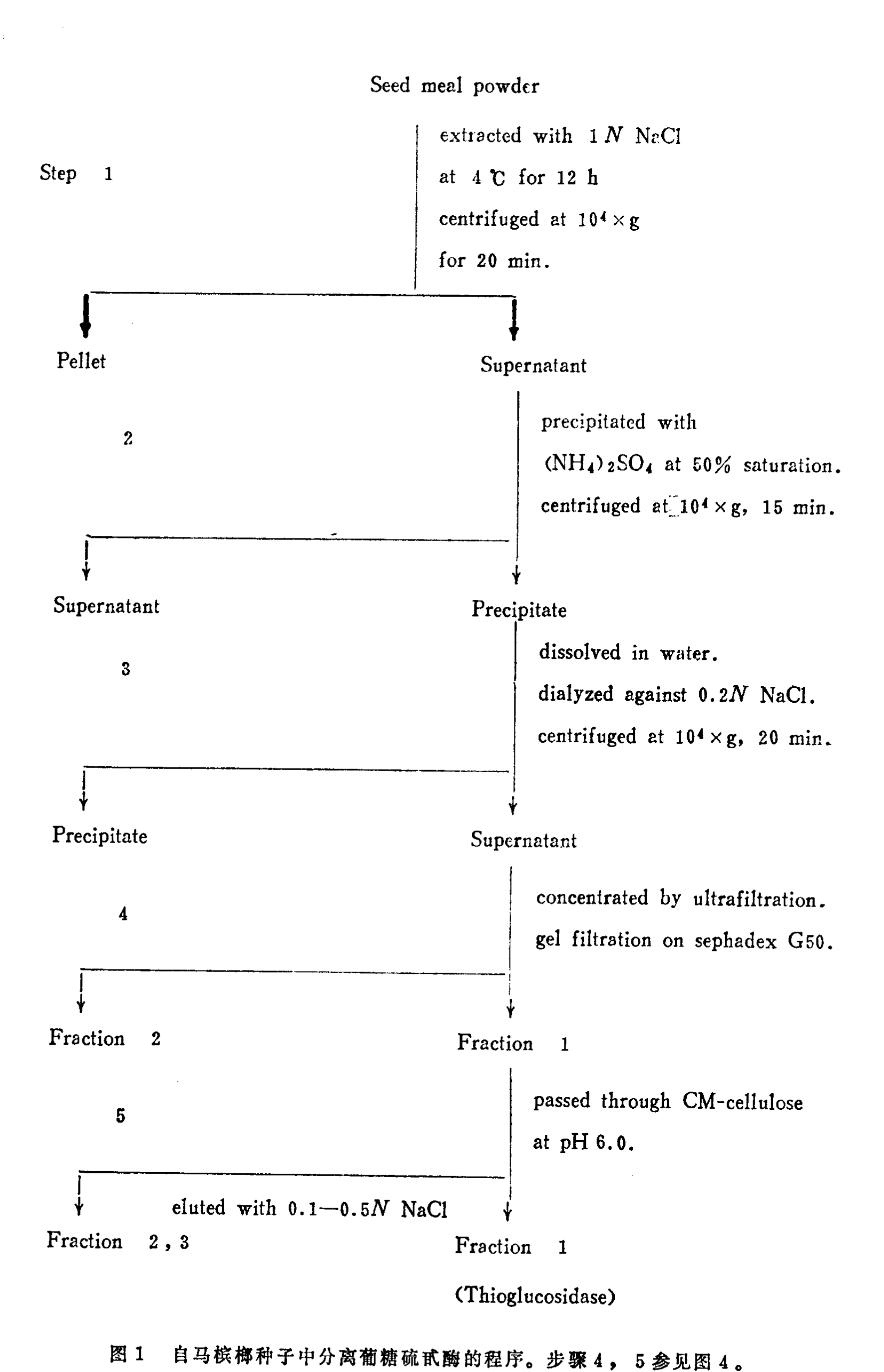


图1　自马槟榔种子中分离葡糖硫甙酶的程序。步骤4，5参见图4。

Fig. 1　Isolation of thioglucosidase from the seeds of *Capparis masaikai* in five steps. See also Fig. 4.

在1 ml含2-羟乙基硫甙硫酸酯钠盐0.1%溶液中，加入0.5 ml pH 6.2、0.2N的磷酸缓冲液，及1 ml 待测的酶溶液，置37℃水浴中30 min；此后，加0.05 N pH 6.2的磷酸缓冲液稀释到25 ml，过PM 5超滤膜，滤出液于1 cm光程吸收池中在紫外分光光度计上记录200—340 nm区域的光谱，并测定227 nm和238 nm处的吸收值A。酶液的蛋白质浓度按Bradford[11]法测定。

由图2测定可知，2-羟乙基葡糖硫甙硫酸酯钠盐在紫外区只有单一吸收峰，$\lambda_M=227$ nm。$\varepsilon=6.95\times10^3$，$E_{227}^{1\%}=197$，$E_{238}^{1\%}=98.5$。其酶解产物噁唑烷硫酮呈单一吸收峰，$\lambda_M=238.5$ nm，$\varepsilon=1.23\times10^4$，$E_{227}^{1\%}=643$，$E_{238}^{1\%}=1190$[5]。据此，酶解程度可由酶解液的超滤液的吸收峰波长判断，峰波长仍在227 nm表明无酶解发生；若峰波长已移到238.5 nm，就表示葡糖硫甙硫酸酯已完全被酶解。可由下式计算出反应液中残留葡糖硫甙硫酸酯钠盐量：

$$GS(mg/ml)=(1.85\times A_{227}-A_{238})/26.4$$

酶活性以每mg蛋白每分钟水解葡糖硫甙硫酸酯钠盐的μg数表示。

5.高效液相色谱（HPLC）分析

在岛津LC-3A色谱仪上，用反相柱Zorbax ODS（4.6mm I.D×25 cm）分析葡糖硫甙硫酸酯及其酶解产物的纯度，洗脱液为含5%甲醇的0.005N硫酸溶液，柱温30℃，流速1.0 ml/min，分别于227 nm和238 nm检测。

结 果 与 分 析

1.葡糖硫甙硫酸酯的鉴定

按本文所述程序所得葡糖硫甙硫酸酯钠盐的紫外光谱在227 nm呈现单峰（图2），在反相高效色谱中为单一洗脱峰（图3），只有极少量杂质。这表明，马槟榔种子含单一成分的葡糖硫甙硫酸酯，其得率可达种仁的3%，按紫外吸收值计算，其在种仁中含量高达4.8%。

该化合物制品的纯度约90%，易潮解，杂质主要是无机钠盐。若用Dowex 50 H^+脱去钠离子，溶液呈强酸性，此时该化合物很不稳定。判定该化合物是2-羟乙基葡糖硫甙硫酸酯的主要依据是其酶解产物为噁唑烷硫酮。图3表明在pH 6.0时酶解产物比较单一，这一酶解产物易于纯化和结晶，其结构式已经精确地测定[2]为噁唑烷硫酮。Daxenbichler等[12]对油菜和芥菜种子中由2-羟基-3-丁烯基葡糖硫甙硫酸酯经酶解形成5-乙烯基噁唑烷硫酮作过详细研究，证明只有2-羟基取代的葡糖硫甙硫酸酯在酶解时才能最后形成噁唑烷硫酮的五元杂环结构。此外，本制品的元素分析结果（%）：C 28.5，H 4.1，S 15.1，N 3.12，与推测其为化合物（Ⅰ）钠盐的理论值（%）：C 28.1，H 4.1，S 16.6，N 3.64已比较接近。

化合物（Ⅰ）在植物中存在尚未见报道。Ahmed等[4]在埃及的马槟榔 *Capparis spinosa* L. 中鉴定出几种葡糖硫甙硫酸酯化合物，未见有2-羟基取代者。马槟榔 *C. masaikai*种子中高含单一成分的化合物（Ⅰ），其意义值得注意。

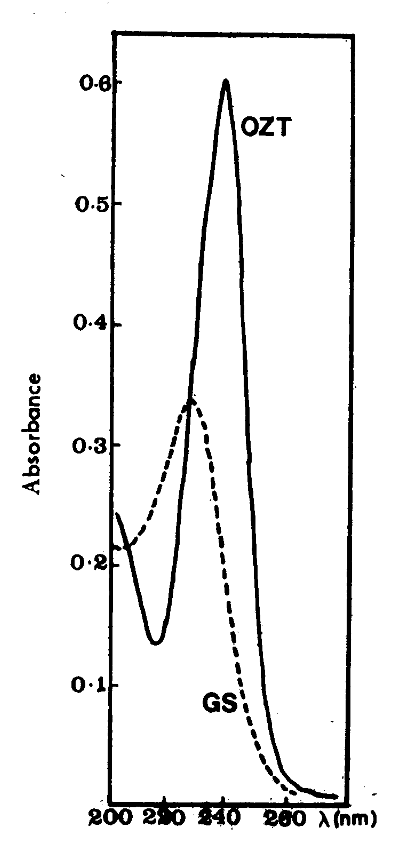


图 2　2-羟乙基葡糖硫甙硫酸酯（GS）和噁唑烷硫酮（OZT）的紫外光谱

Fig. 2　UV spectra of 2-hydroxyethylglucosinolate (GS) and oxazolidine-2-thione(OZT) in an aqueous solution at pH 6.0. GS $\lambda_M = 227$nm, $\varepsilon = 6.95 \times 10^3$; OZT: $\lambda_M = 238.5$ nm, $\varepsilon = 1.23 \times 10^4$.

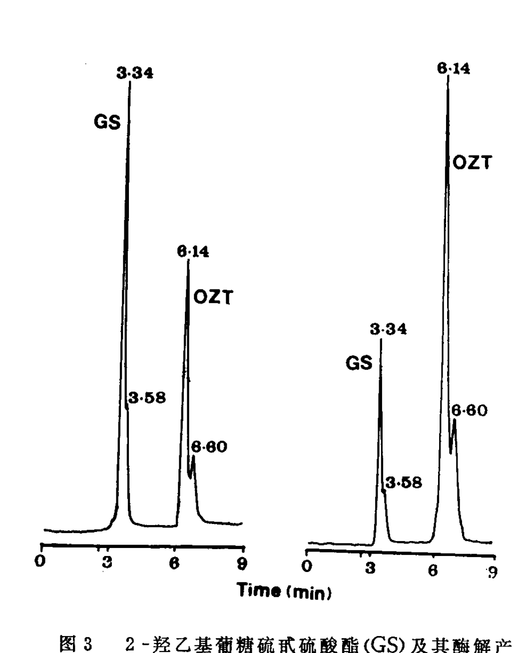


图 3　2-羟乙基葡糖硫甙硫酸酯(GS)及其酶解产物噁唑烷硫酮（OZT）的反相高效液相色谱

Fig. 3　Reversed-phase HPLC of 2-hydroxyethylglucosinolate (GS) and its enzymatic product oxazolidine-2-thione (OZT). Zorbax ODS column, mobile phase: aqueous solution of 5×10^{-3} N of sulfuric acid and 5% of methanol, detector: 227 nm (left) and 238 nm (right). Loaded sample was the mixture of GS and OZT. GS preparation gave peak GS only, and the OZT preparation gave peak OZT only.

2. 葡糖硫甙酶的提取和纯化

预试证明，马槟榔种仁粉末用水和稀缓冲液提取，提取液测不出该酶活性，酶活性存留于残渣中；用0.5% Triton x-100的水溶液也不能提取出酶。用 1 N氯化钠提取的提取液对蒸馏水透析，出现大量沉淀，只有沉淀才显示有酶活性。以上试验表明，该酶在提取中由于盐键被结合在一种沉淀中。这一沉淀的成分是碱性蛋白和植酸。据此，图 1 中采用 1 N盐溶液提取酶，继用硫酸铵沉淀蛋白使之与植酸分离，这样分离出大部分酶（见表 1，(1)、(3)）。从马槟榔种子提取葡糖硫甙酶困难的原因便是其中含有大量强碱性清蛋白及能与之结合形成沉淀的植酸。

自酶提取液中纯化酶比较容易。由图 4 和表 1 结果看出，酶提取液通过 Sephadex G50柱层析，可将酶与大量的分子量小于 3 万的蛋白分离；再通CM-纤维素柱，使之与

残留的碱性蛋白分离，便得到纯制品。马槟榔种子蛋白主要成分是分子量仅为 11.6 kD 的碱性蛋白[4]，这是纯化葡糖硫甙酶比较容易的原因。

表 1 马槟榔种子中葡糖硫甙酶的纯化

Table 1 Purification of thioglucosidase from the seed meal of *Capparis masaikai*

Protein fraction**	Total protein (mg/g of seed meal)	Enzyme activity units*	Total activity units
(1) Extract	194	—	—
(3) 50% $(NH_4)_2SO_4$,			
dialyzed			
supernatant	156	0.56	87.4
precipitate	20	1.8	36.0
(4) Sephadex G50			
fraction 1	3.3	26.1	85.8
fraction 2	96.2	0	0
(5) CM-cellulose			
fraction 1	0.4	167	65.1
fraction 2	1.4	0	0

* 1 unit defined as 1 μg of degraded glucosinolate (GS) per minute by 1 mg of protein (μg GS × min^{-1} × mg $protein^{-1}$)

** steps see Fig. 1 and Fig. 4

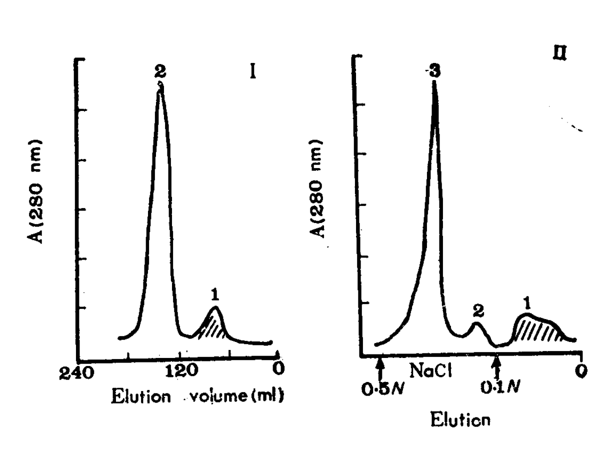


图 4 葡糖硫甙酶的纯化。酶提取液通过Sephadex G50凝胶柱（Ⅰ），组分 1 具酶活性。组分 1 通过CM-cellulose离子交换柱（Ⅱ），流出部分 1 具酶活性。

Fig. 4 Purification of thioglucisidase. The extract was firstly passed through a sephadex G50 column at pH 6.0(Ⅰ), only the fraction 1 had enzyme activity, which then was loaded on a CM-celluloes column(Ⅱ), from this column the flowing out fraction 1 showed enzyme activity.

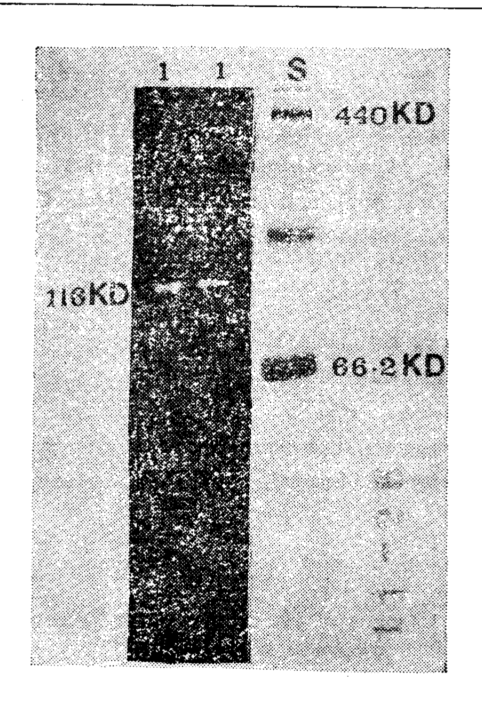


图 5　葡糖硫甙酶的聚丙烯酰胺浓度梯度电泳。标准分子量蛋白（S），用考马氏兰染色。葡糖硫甙酶用特异酶反应后形成白色沉淀带（1），分子量116 kD。

Fig. 5　Gel concentration gradient PAGE of thioglucosidase. The standard proteins (S) BAS(66.2 kD) and ferritin (440 kD) were stained with Coomassie Blue. The enzyme preparation was stained by specific enzymatic reaction, a white precipitated band with Mr = 116 kD was showed (lane 1).

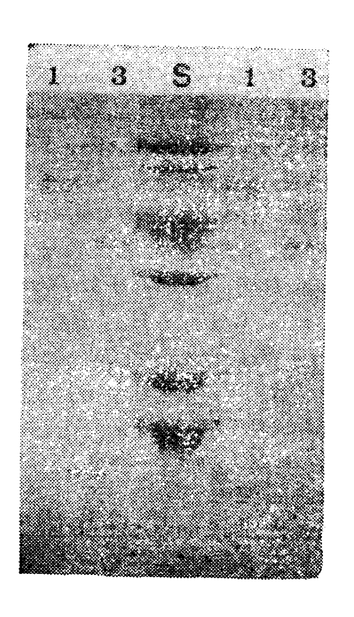


图 6　葡糖硫甙酶SDS聚丙烯酰胺电泳。S为标准分子量蛋白。1为葡糖硫甙酶，显示二带Mr各为58和56kD。3为图4中的组分3。

Fig. 6　SDS-PAGE of thioglucosidase. Lane S was the standard molecular weight proteins. Lane 1 was thioglucosidase, in which two bands with Mr = 58 kD and 56 kD were showed. Lane 3 was another fraction of proteins (see Fig. 4 fraction 3).

3.葡糖硫甙酶的特性

不加变性剂处理的聚丙烯酰胺电泳显示葡糖硫甙酶的分子量为 116 kD（图5）。SDS-聚丙烯酰胺电泳显示该酶由二个相近的亚基组成，其分子量各为58和56 kD(图6)。在pH 5—7 的等电聚焦电泳管上，酶带位于胶柱酸性端接近界面处，等电点 5.05。在凝胶板上，用PAS染色未见出现红色的糖特异染色带，表明该酶不是糖蛋白；酶样品用酚-硫酸测定结果，含糖量小于 1 %，也表明酶不是糖蛋白。Bjorkman等[13]从油菜种子中分离出的葡糖硫甙酶（myrosinase），分子量140 kD，包含二个相同的亚基，pI 5.08，含糖量15%。由比较可知，马槟榔葡糖硫甙酶与后者显著不同处仅在于二者含糖量不同，前者检不出含糖，后者是糖蛋白。在马槟榔种子中，葡糖硫甙酶合成后可能没有糖基化的修饰过程。

参考文献

1 Kjaer A. Chem. Bot. Classification, Proc. Nobel Symp., 25 th, 1973; 229—323

2 Mithen R F, Lewis B G, Heaney R K, Fenwick G R. *Phytochemistry* 1987; 26: 1969—1973

3 Tookey H L, Vanetten C H, Daxenbichler M E. Glucosinolates, in: Liener I E(ed), Toxic Constituents of Plant Food Stuffs. New York: Academic Press, 1980; 103—106

4 胡忠，何敏．云南植物研究 1983; 5: 212—217

5 胡忠，梁丽，何敏．云南植物研究 1987; 9: 113—115

6 张龙翔主编．生化实验方法和技术．北京：高等教育出版社，1981; 119—121

7 Henderson H M, Macewan J J. *Phytochemistry* 1972; 11: 3127—3133

8 Pihakaski K, Ivensen T H. *J Exp Bot* 1976; 27: 242—258

9 Pharmacia Fine Chemicals. Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Laboratory Techniques, Revised Edition.

10 Whister R L, Wolfrom M L (eds). Methods in Carbohydrate Chemistry. New York: Academic Press, 1962; 388—389

11 Bradford M M. *Anal Biochem* 1976; 72: 248—254

12 Daxenbichler M E, VanEtten C H, Wolff I A. *Biochemistry* 1965; 4: 318—323

13 Bjorkman R. Plant Myrosinases, in: The Biology and Chemistry of The Cruciferae, (ed) Vangnam J G. London: Academic Press, 1976; 191—205

THE GLUCOSINOLATES AND THIOGLUCOSIDASE OF CAPPARIS MASAIKAI SEEDS

Hu Zhong

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming)

Abstract A new glucosinolate, the 2-hydroxyethylglucosinolate was isolated and identified from seeds of *Capparis masaikai* Lévl, with a yield of 3% of dry seed meal. Its enzymatic product at pH 6.0 was oxazolidine-2-thione. The thioglucosidase was extracted from seed meal powder with 1 *N* NaCl, precipitated with ammonium sulfate, and futher purified by gel filtration on Sephadex G50 and being passed through a CM-cellulose column. The purified thioglucosidase was showed to be of Mr = 116 kD, pI = 5.05, consisted of two near equal subunits. It differs from the thioglucosidases isolated from the seeds of Cruciferae, which are glycoproteins with Mr = 140 kD and a carbohydrate content of 15%, in that it was showed not to contain carbohydrate.

Key words *Capparis masaikai*; Glucosinolate; 2-Hydroxyethylglucosinolate; Thioglucosidase